昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, August 2005, 48(4):518 - 525 ISSN 0454-6296

不同生物型烟粉虱体内 *Wolbachia* 共生菌的检测及其系统树分析

褚栋[1,2]**,丛斌**[3]**,张友军**[1*]**,徐宝云**[1]**,吴青君**[1]**,朱国仁**[1]

(1.中国农科院蔬菜花卉研究所,北京 100081;2.山东省农业科学院高新技术研究中心,济南 250100;
3.沈阳农业大学植物保护学院,沈阳 110161)

摘要: *Wolbachia* 是广泛分布于节肢动物体内一类共生细菌,它能够通过多种机制调控宿主的生殖方式。近年来的研究表明,*Wolbachia* 与许多外来生物的成功入侵相关。本文利用长 PCR 的方法特异扩增了不同生物型烟粉虱(共 24 个种群)体内 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因,结果发现 B 型和 Q 型烟粉虱入侵种群体内均未检测到 *Wolbachia*,而在非 B/Q 型的浙江种群和肯尼亚种群体内检测到了 *Wolbachia*。对该 *wsp* 基因进行测序并和已知序列进行同源性分析发现,浙江烟粉虱种群的 *Wolbachia* 属于 B 组 Con/Rug 亚种群,而肯尼亚种群属于 B 组 Btab1 亚种群。*Wolbachia* 的存在与否可能与烟粉虱的成功入侵有一定的关系。

关键词:烟粉虱;*Wolbachia*;*wsp* 基因;生物入侵;支序分析

中图分类号:Q965.8 **文献标识码:**A **文章编号:**0454-6296(2005)04-0518-08

Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in different *Bemisia tabaci* biotypes

CHU Dong[1,2], CONG Bin[3], ZHANG You-Jun[1*], XU Bao-Yun[1], WU Qing-Jun[1], ZHU Guo-Ren[1] (1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. High-tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: *Wolbachia* is a maternally inherited bacterium that may manipulate the reproduction of its arthropod hosts. Recent research showed that *Wolbachia* may have contributed to the success of invasive populations. We reported the survey for the presence of *Wolbachia* endosymbionts in *Bemisia tabaci* biotypes (24 different populations) using Long PCR method to amplify the *wsp* gene. The results showed that there were no *Wolbachia* in both invasive *B. tabaci* B biotype and Q biotype, while a strain of *Wolbachia* was detected in the non-B/Q biotype of *B. tabaci* both from Zhejiang province and Kenya. Sequencing and phylogenetic analysis showed that the strain infesting *B. tabaci* from Zhejiang province belonged to Con/Rug subgroup of *Wolbachia* B group, and the strain infesting *B. tabaci* from Kenya belonged to Btab1 subgroup of *Wolbachia* B group. The presence or abscence of *Wolbachia* may be related to successful invasion of *B. tabaci*.

Key words: *Bemisia tabaci*; *Wolbachia*; *wsp* gene; biological invasion; phylogenetic analysis

Wolbachia 是广泛分布于节肢动物生殖组织内的一类共生细菌,它可以通过诱导宿主胞质不亲和、孤雌生殖、雌性化和雄性致死等来调控宿主的生殖方式,被认为与性别决定和物种形成等重要生物学问题密切相关(Werren,1997 龚鹏等,2002)。近年来的一些研究表明,*Wolbachia* 的感染能够对宿主产生许多负面影响,可能与外来生物的成功入侵密切相关(Wenseleers *et al*.,2002;Tsutsui *et al*.,2003)。

烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)是一种世界性的重要经济害虫,依据其寄主范围、危害习性和传毒能力等方面的差异,至少可分为 24 种生物型(Perring,2001),其中 B 型和 Q 型烟粉虱是近 20 年来传入世界各地并爆发成灾的重要入侵害虫(褚栋等,2004,2005a,2005b);已有研究表明,B 型烟粉虱的入侵与其对土著烟粉虱的生态位竞争、生殖干涉以及较强的抗药性有关(褚栋等,2004)。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2002CB111400) 国家自然科学基金项目(30170625);农业部蔬菜遗传与生理重点实验室资助项目

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.:010-68919518;E-mail:zhangyj@mail.caas.net.cn

收稿日期 Received:2004-11-12;接受日期 Accepted:2005-01-23

已有研究还发现，长 PCR 方法比常规 PCR 方法能够显著提高 *Wolbachia* 的检测率（Jeyaprakash and Hoy，2000）。本研究利用长 PCR 方法检测了世界各地 24 个烟粉虱种群的 *Wolbachia* 感染情况，发现不同生物型烟粉虱种群中 *Wolbachia* 的感染率有较明显的差异，在具有入侵能力的 B 型和 Q 型烟粉虱的 20 个种群体内均未检测到 *Wolbachia*，而在 4 个非 B/Q 型烟粉虱种群中有 2 个种群被 *Wolbachia* 感染；最后就 *Wolbachia* 在外来烟粉虱成功入侵过程中的作用进行了探讨。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

从世界各地采集了 24 个烟粉虱种群，其采集地点、寄主植物、生物型、采集时间如表 1 所示，样品均在 -20℃低温保存。其中北京海淀和云南昆明 Q 型烟粉虱为我国入侵种群（褚栋等，2005a，2005b），Arizona 州 B 型烟粉虱由美国 Arizona 大学 Judy Brown 博士赠送，Texas 州 B 型烟粉虱由美国农业部 Matthew Ciomperlik 博士赠送，以色列 B 型和 Q 型烟粉虱由以色列 Volcani Center 农业研究中心 Rami Horowitz 博士赠送。

1.2　DNA 的提取

0.2 mL Eppendorf 离心管加入 10 头烟粉虱成虫和 100 μL 裂解液（1% SDS，10 mmol/L Tris-HCl，pH = 8.0，25 mmol/L NaCl，25 mmol/L EDTA），用封口枪头倒碎，65℃温浴 30 min；在离心管中加等体积的酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1），轻轻混匀，抽提 5 min，4 000 r/min 离心 5 min，吸取上清液，并将其转移到新的离心管中；重复抽提 3 次。在最后得到的上清液中加入 2 倍体积的冷冻无水乙醇，-20℃过夜。然后 12 000 r/min 离心 10 min，沉淀下来的 DNA 用 70%的乙醇洗涤一次，ddH$_2$O 定容后放置 -20℃保存备用；每个烟粉虱种群均至少重复 3 次。

1.3　长 PCR 方法检测烟粉虱体内的 *Wolbachia*

使用 *wsp* 基因的一对通用引物（81F，691R）（Zhou *et al*.，1998），长 PCR 方法检测 *Wolbachia*，反应体系和程序参考 Jeyaprakash 和 Hoy（2000）并加以改进。反应体系 20 μL，含 2 μL 反应缓冲液，0.4 U Pfu 和 2 U Taq 酶，2 mmol/L MgCl$_2$，0.35 mmol/L dNTP，引物（81F，691R）各 2 μmol/L，模板 DNA 为 1 μL，用 ddH$_2$O 定容至 20 μL。反应产物置于 4℃冰箱保存，以 1.5%琼脂糖凝胶电泳分离，EB 染色后在紫外透视仪上观察，记录结果。

表 1　样品来源及其相关信息

Table 1　Data of samples of whiteflies collected from different locations

采集地点 Sampling locations	寄主植物 Host plant	生物型 Biotype	采集时间 Sampling date
以色列-1 Israel-1	-	B	2003.8
西班牙巴塞罗那-1 Barcelona，Spain-1	-	B	2003.8
美国亚利桑那州 Arizona，USA	扶桑 Hibiscus	B	2003.8
美国加利福尼亚州 California，USA	茄子 Eggplant	B	2003.9
美国德克萨斯州 Texas，USA	-	B	2003.9
澳大利亚 Australia	-	B	2004.1
山东枣庄 Zaozhuang，Shandong	黄瓜 Cucumber	B	2003.8
河南郑州 Zhengzhou，Henan	甘蓝 Broccoli	B	2003.10
北京海淀 Haidian，Beijing	黄瓜 Cucumber	B	2003.8
江苏南京 Nanjing，Jiangsu	棉花 Cotton	B	2003.7
浙江-1 Zhejiang-1	-	B	2003.8
新疆吐鲁番 Tulufan，Xinjiang	-	B	2003.10
山东泰安 Taian，Shandong	-	B	2003.8
吉林长春 Changchun，Jilin	-	B	2003.8
海南海口 Haikou，Hainan	变色木 Red horsechestnut	B	2003.8
河北保定 Baoding，Hebei	-	B	2003.8
以色列-2 Israel-2	-	Q	2003.8
西班牙巴塞罗那-2 Barcelona，Spain-2	-	Q	2003.8
北京海淀-2 Haidian，Beijing-2	甘蓝 Broccoli	Q	2003.8
云南昆明 Kunming，Yunnan	一品红 Poinsettia	Q	2003.8
浙江-2 Zhejiang-2	-	非 B/Q non B/Q	2003.8
广东广州 Guangzhou，Guangdong	茄子 Eggplant	非 B/Q non B/Q	2003.8
肯尼亚 Kenya	-	非 B/Q non B/Q	2003.8
巴基斯坦 Pakistan	棉花 Cotton	非 B/Q non B/Q	2003.8

“-’表示未知。“-”indicates unknown.

1.4　序列测定与数据分析

PCR 产物纯化后，双向测序，测序结果提交 GenBank 通过 BLAST 检索 GenBank 中所有的烟粉虱共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因。用 Clustal X 多序列比对程序(Thompson *et al*.，1997)将烟粉虱不同生物型种群和国外种群进行对位排列。用 MEGA2 软件(Kumar *et al*.，2001)，根据 Kimura 2-paramter 模型计算出烟粉虱不同种群共生菌 *Wolbachia* 的进化分歧矩阵 采用 Kimura 2-paramter 模型，邻位法(NJ)、最小进化法(ME)和最大简约法(MP)构建系统树(检索的相同序列仅取一条)，系统树各分支的置信度(Bootstrap)均进行 1 000 次的重复检验。

2 结果与分析

2.1 检测结果

在 24 个烟粉虱种群中，广东省广州地区、巴基斯坦采集的非 B/Q 型烟粉虱和所有 B 型烟粉虱和 Q 型烟粉虱均没有检测到 *Wolbachia*，而在我国浙江省非 B/Q 型烟粉虱体内检测到了 *Wolbachia*，其测序结果提交 GenBank，登录号为 AY567791(品系代码：ZJNB)；肯尼亚非 B/Q 型烟粉虱体内检测到了 *Wolbachia*，其测序结果提交 GenBank，登录号为 AY596954(品系代码：Kenya)。

通过 BLAST 检索 GenBank 中所有的烟粉虱共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因共 16 条，其登录号以及相应品系代码分别为：AJ291386：wBtab15；AJ291385：wBtab14；AJ291384：wBtab13；AJ291383：wBtab12；AJ291382：wBtab11；AJ291381：wBtab10；AJ291380：wBtab9；AJ291379：wBtab8；AJ291378：wBtab7；AJ291377：wBtab6；AJ291376：wBtab5；AJ291375：wBtab4；AJ291374：wBtab3；AJ291373：wBtab2；AJ291372：wBtab1；AF217717：wTab-B1。上述 *Wolbachia* 均属于 B 组(Nirgianaki *et al*.，2003)。以 A 组中的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 共生菌 *Wolbachia* 品系 wMel(AF027702)为外群，对浙江省和肯尼亚非 B/Q 型烟粉虱体内检测到的 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列与 GenBank 中烟粉虱共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列进行排序(图 1)。

2.2 烟粉虱共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因序列分析

基于 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列，以黑腹果蝇共生菌 *Wolbachia* 品系 wMel(AF027702)为外群，根据 Kimura 2-paramter 模型计算出烟粉虱体内共生菌 *Wolbachia* 的进化分歧矩阵(表 2)。由进化分歧矩阵可以看到，wBtab13、wBtab10、wBtab12、wBtab15、wBtab1、wBtab2、wBtab5、ZJNB、wBtab4、wBtab3、wBtab6、wBtab11、wBtab9 序列差异均小于 3.0%，碱基差异在 16 个以下，其中 ZJNB 与 wBtab1、wBtab2、wBtab5 完全相同；它们与 Kenya、wBtab7、wBtab8、wBtab14、wTab-B1 的序列差异在 7.8% ~ 22.7% 之间，相差碱基在 44 个以上。Kenya 和 wBtab7 碱基完全相同，它们与 wBtab8、wBtab14、wTab-B1 相互之间的序列差异均在 12% 以上，碱基相差在 64 个以上。

```
wBtab5   TACGTTCGTT TACAATACAA CGGTGAAATT TTACCTTTTT ATACAAAAGT TGATGGTATT ACAAATGCAA CAGGTAAAGA A [ 81]
ZJNB     .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab2   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab1   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab10  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab13  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab12  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab15  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab3   .......... .......... .......... .......... ......C... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab4   .......... .......... .......... .......... ......C... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab6   .......... .......... .......... .......... ......C... .......... .......... .......... . [ 81]
wBtab9   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... A..A...... . [ 81]
wBtab11  ........C. .......... .......... .......... .......... .......... .......... A..A...... . [ 81]
wBtab7   .......... .......... .......G.. .........A .A....GA.. .......G.. ...T..AA.T .......G.. G [ 81]
Kenya    .......... .......... .......G.. .........A .A....GA.. .......G.. ...T..AA.T .......G.. G [ 81]
wBtab8   .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...C..A..T ........-- - [ 81]
wTab-B1  ..T....... .G....T... T......G.. .........A .A...G.A.. ...C..C... GA.T..AA.. A...A..C.. . [ 81]
wBtab14  ..T......G .G....T... T......G.. .........A .A...G.A.. ...C..C... GA.T..AA.. A...A.CC.. . [ 81]
wMel     .......... .G........ .......T.. ......C... TC........ .......... ..CT..AAG. A..AC..GAG T [ 81]
```

```
wBtab5   AAGGATAGTC CCTTAACAAG ATCTTTTATA GCTGGTGGTG GTGCATTTGG TTATAAAATG GATGACATTA GAGTTGATGT T [162]
ZJNB     .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab2   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab1   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab10  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab13  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab12  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab15  .......... .......... .......... ......A... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab3   .......... .........T .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab4   .......... .........T .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab6   .......... .........T .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wBtab9   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....T.... .......... . [162]
wBtab11  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....T.... .......... . [162]
wBtab7   ..CA...... ......A.GC .......C.. .....A.... .......... .......... .....T..C. .G........ . [162]
Kenya    ..CA...... ......A.GC .......C.. .....A.... .......... .......... .....T..C. .G........ . [162]
wBtab8   ------.... ......A.GC .......C.. .......... .......... .......... .......... .......... . [162]
wTab-B1  GTTC..GA.. .T....A.GC .......G.G .......... C......... .......... ..C..T..C. .G........ . [162]
wBtab14  GTTC..GA.. .T....A.GC .........C T......... C......... .......... ..C..T..C. .G........ . [162]
wMel     G.TT.C.... .A....A.CC .......... .......... .......... ...C...... ..C.....C. .G........ . [162]

wBtab5   GAAGGGCTTT ACTCACAATT GGCTAAAGAT ACAGCT-GTA GTAAA-TACT T----CTGAA ACAAATGTTG CAGACAGTTT A [243]
ZJNB     .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab2   .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab1   .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab10  .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab13  .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab12  .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab15  .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab3   .......... .......... .......... ......-... T....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab4   .......... .......... .......... ......-... T....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab6   .......... .......... .......... ......-... T....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab9   .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab11  .......... .......... .......... ......-... .....-.... .----..... .......... .......... . [243]
wBtab7   .....A.... .......... .AG....... G...A.-... ...------. -----....T GAC..G.C.. ....T...G. . [243]
Kenya    .....A.... .......... .AG....... G...A.-... ...------. -----....T GAC..G.C.. ....T...G. . [243]
wBtab8   .......... .......... .......... ......-... .....-.G.. .----..... .......... .......... . [243]
wTab-B1  ..G..A.... ........C. AAAC...A.C GAC.T.A..G ..GC.AC.T. .A---..CC. ....C..... ..A.....G. G [243]
wBtab14  ..G..A.... ........C. AAAC...A.C GAC.T.A..G ..GC.AC.T. .A---..CC. ....C..... ..A.....G. G [243]
wMel     .....AG... .T...T.CC. AAAC...A.. GAT.T.AAAG A.GT.AC.T. .GACC.A.C. .AT.C.A... ........G. . [243]

wBtab5   ACAGCATTTT CAGGATTGGT TAACGTTTAT TACGATATAG CGATTGAAGA TATGCCTATC ACTCCATACG TTGGTGTTGG T [324]
ZJNB     .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab2   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab1   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab10  ..-....... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... C [324]
wBtab13  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab12  G......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab15  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab3   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab4   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab6   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab9   ....T..... .......... .......... ..T....... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab11  .......... .......... .......... ..T....... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab7   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
Kenya    .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab8   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wTab-B1  G......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wBtab14  G...T..... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [324]
wMel     ......A... ........A. G....G.... .......... .A........ .......... .........A .......... . [324]
```

```
wBtab5   GTTGGTGCAG CATATATCAG CAATCCTTCA AAAGCTGATG CAGTTAAAGA TCAAAAAGGA TTTGGTTTTG CTTATCAAGC A [405]
ZJNB     .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab2   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab1   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab10  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab13  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab12  .......... .......... .......... ...A...... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab15  .......... .......... .......... ...A...... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab3   .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... C [405]
wBtab4   .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... . [405]
wBtab6   .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... . [405]
wBtab9   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab11  .........C .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab7   .......... .......... .......... .......... T......... .......... .......... .......... . [405]
Kenya    .......... .......... .......... .......... T......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab8   .......... .......... .......... ......AG.. .......... .......... .......... .......... . [405]
wTab-B1  .......... .......... .......... G.....AG.. .......... .......... .......... .......... . [405]
wBtab14  .......... .......... .......... G.....AG.. .......... .......... .......... .......... . [405]
wMel     .......... .G.....T.. ..C.....TG G..C.C.C.. TGAA.G.TC. AA...GTAA. .......... ..GG.....T . [405]

wBtab5   AAAGCTGGTG TTAGTTATGA TGTAACTCCA GAAATCAAAC TCTTTGCTGG AGCTCGTTAC TTCGGTTCTT ATGGTGCTAG T [486]
ZJNB     .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab2   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab1   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab10  .......... .......... C......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab13  .......... .......C.. .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab12  .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab15  .......... .......... .......... .......... ...C...... .......... .......... .......... . [486]
wBtab3   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab4   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab6   .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab9   .......... .......... ......C... .......... .......... .......... .......... .........A . [486]
wBtab11  .......... .......... ......C... .......... .......... .N........ .......... .......... . [486]
wBtab7   .......... .......... ......C... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
Kenya    .......... .......... ......C... .......... .......... .......... .......... .......... . [486]
wBtab8   .......... .......... ......C.T. ........G. .T.A...... .........T ..T....... .......... . [486]
wTab-B1  .......... .......... ......C... ........G. .T.A...... T........T ..T....... ........C. . [486]
wBtab14  .......... .......... ......C... ........G. .T.A...... T........T ..T....... .......... . [486]
wMel     .......... .......... .......... ...G...... .T.A...... .........T .......... .........A . [486]

wBtab5   TTTGATAAGG CAG------- ---------- ----CTAAGG ATGATACTGG TATCA----- -AAAATGTTG TTTACAGCAC [566]
ZJNB     .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... .......... [566]
wBtab2   .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... .......... [566]
wBtab1   .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... .......... [566]
wBtab10  .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... .......... [566]
wBtab13  .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... .......... [566]
wBtab12  .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... .......... [566]
wBtab15  .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... .......... [566]
wBtab3   .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... ......A... [566]
wBtab4   .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... ......A... [566]
wBtab6   .......... ...------- ---------- ----...... .......... .T...----- -......... ......A... [566]
wBtab9   .......... ...------- ---------- ----...... .......... .....----- -......... ......A..T [566]
wBtab11  .......... ..C------- ---------- ----...... ..A....... .....----- -......... ......A..T [566]
wBtab7   .......... ..A------- ---------- ----...... .......... .....----- -........C .......... [566]
Kenya    .......... ..A------- ---------- ----...... .......... .....----- -........C .......... [566]
wBtab8   ...A....A. A.A------- ---------- ----.AGTAT CA.C....AA AGAG.----- -TC..C..CC ........G. [566]
wTab-B1  ...A....A. ACA------- ---------- ----.AGTAT CA.C....AA AGAG.----- -TC.T...CC ........G. [566]
wBtab14  ...A....A. A.A------- ---------- ----.AGTAT CA.C.G..AA AGAG.----- -TC..C..CC ........G. [566]
wMel     ......GGAA A.AAAACAGA TCCTAAAAAT TCAA.CGGAC .G.C.G...A .GCAGGCGCA T.C..A...C .......... [566]
```

图 1 烟粉虱不同种群共生菌 *Wolbachia* 的 *wsp* 基因部分序列排序图

Fig. 1 Alignment of *wsp* gene of *Wolbachia* infesting different populations of *B*. *tabaci*

以黑腹果蝇共生菌 *Wolbachia* 品系 wMel 作外群。“ . ”表示相同碱基；“ - ”表示碱基缺失。

Wolbachia strain wMel in *Drosophila melanogaster* as outgroup. “ . ” = Identical; “ – ” = Indel.

表 2 烟粉虱不同种群体内 *Wolbachia*（外群：黑腹果蝇共生菌 *Wolbachia* 品系 wMel）基于 *wsp* 序列的进化分歧矩阵（Kimura 2-paramter 模型）

Table 2 Evolutionary divergence of *Wolbachia* infesting different *B. tabaci* populations (outgroup: *Wolbachia* strain wMel in *Drosophila melanogaster*) based on *wsp* gene (Kimura 2-paramter model)

	[1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19]
[1]																			
[2]	0.000																		
[3]	0.000	0.000																	
[4]	0.000	0.000	0.000																
[5]	0.004	0.004	0.004	0.004															
[6]	0.002	0.002	0.002	0.002	0.006														
[7]	0.004	0.004	0.004	0.004	0.008	0.006													
[8]	0.006	0.006	0.006	0.006	0.009	0.008	0.006												
[9]	0.011	0.011	0.011	0.011	0.015	0.013	0.015	0.017											
[10]	0.009	0.009	0.009	0.009	0.013	0.011	0.013	0.015	0.002										
[11]	0.011	0.011	0.011	0.011	0.015	0.013	0.015	0.017	0.004	0.002									
[12]	0.017	0.017	0.017	0.017	0.021	0.019	0.021	0.023	0.025	0.023	0.025								
[13]	0.021	0.021	0.021	0.021	0.025	0.023	0.025	0.027	0.029	0.027	0.029	0.011							
[14]	0.078	0.078	0.078	0.078	0.083	0.080	0.082	0.085	0.089	0.087	0.089	0.089	0.091						
[15]	0.078	0.078	0.078	0.078	0.083	0.080	0.082	0.085	0.089	0.087	0.089	0.089	0.091	0.000					
[16]	0.083	0.083	0.083	0.083	0.087	0.085	0.087	0.087	0.094	0.092	0.091	0.098	0.100	0.120	0.120				
[17]	0.211	0.211	0.211	0.211	0.217	0.214	0.211	0.216	0.221	0.219	0.219	0.219	0.222	0.188	0.188	0.130			
[18]	0.216	0.216	0.216	0.216	0.222	0.219	0.216	0.222	0.226	0.224	0.224	0.219	0.227	0.196	0.196	0.132	0.021		
[19]	0.264	0.264	0.264	0.264	0.271	0.267	0.267	0.267	0.269	0.267	0.267	0.273	0.282	0.254	0.254	0.248	0.252	0.249	

注 Notes：[1] wBtab5；[2] ZJNB；[3] wBtab2；[4] wBtab1；[5] wBtab10；[6] wBtab13；[7] wBtab12；[8] wBtab15；[9] wBtab3；[10] wBtab4；[11] wBtab6；[12] wBtab9；[13] wBtab11；[14] wBtab7；[15] Kenya；[16] wBtab8；[17] wTab－B1；[18] wBtab14；[19] wMel.

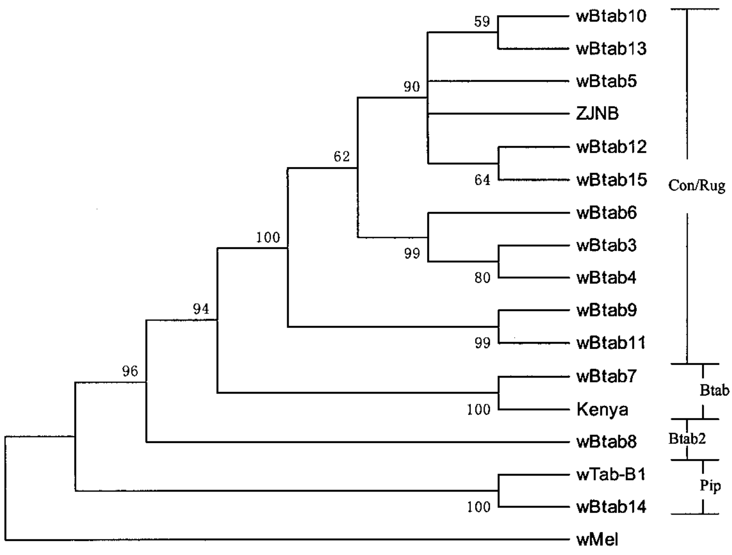

图 2 采用 MEGA2 的邻位法（NJ）构建 *B. tabaci* 共生菌 *Wolbachia* 的系统树

Fig. 2 Phylogenetic trees of *Wolbachia* infesting *B. tabaci* constructed by NJ method based on *wsp* sequence with 1 000 Bootstrap replications

以黑腹果蝇共生菌 *Wolbachia* 品系 wMel 为外群，1 000 次的重复检验。

Outgroup: *Wolbachia* strain wMel in *Drosophila melanogaster*.

2.3 根据 *Wolbachia* 的 *wsp* 序列构建系统发育树

采用 MEGA2 软件邻位法（NJ）方法构建系统树，GenBank 中 wBtab1，wBtab2，wBtab5 序列相同，仅采用 1 条（wBtab5）为代表，各分支的置信度（Bootstrap）均进行 1 000 次的重复检验（图 2），根据 Zhou 等（1998）的亚种群的分类对系统树进行划分。由图 2 所示根据置信度，烟粉虱感染 *Wolbachia* 品系可分为 4 支；其中 wBtab13、wBtab10、wBtab12、wBtab15、wBtab5、ZJNB、wBtab4、wBtab3、wBtab6、wBtab11 和 wBtab9 聚集为一支，属 Con/Rug 亚种群；Kenya、wBtab7 为一支，属 Btab1 亚种群；wBtab8 为一支，属 Btab2 亚种群；wBtab14、wTab-B1 为一支，属 Pip 亚种群。使用最小进化法（ME），最大简约法（MP）和邻位法（NJ）构建的系统树基本相同。

3 讨论

近年来，外来生物入侵机制假说——“逃避天敌假说”日益得到重视（Mitchell and Power，2003；Torchin *et al*.，2003）。一些对外来入侵害虫在传入地区和原产地 *Wolbachia* 感染率的比较发现入侵种群往往很少受到 *Wolbachia* 的感染，如在入侵生物火蚁 *Solenopsis invicta* 与 *S*. *richteri*（Shoemaker *et al*.，2000）、阿根廷蚂蚁 *Linepithema humile*（Tsutsui *et al*.，2003）中均发现了这种现象，可能是由于这些入侵害虫逃脱了该共生菌的负面影响而能够在传入地区迅速定殖、扩散和爆发，因此 *Wolbachia* 可能是一些外来害虫种群在原产地增长的限制因子（Shoemaker *et al*.，2000；Tsutsui *et al*.，2003）。

本项研究结果发现表明，B 型和 Q 型烟粉虱种群体内均未检测到 *Wolbachia*，而在非 B/Q 型的浙江种群和肯尼亚烟粉虱（非入侵种群）体内检测到了 *Wolbachia*；根据遗传距离以及系统树可知，其体内 *Wolbachia* 品系分别属于 Con/Rug 亚种群和 Btab1 亚种群。Nirgianaki 等（2003）的研究表明，13 个 B 型烟粉虱种群中仅有其原产地之一的也门种群被 *Wolbachia* 感染，在 26 个非 B 型烟粉虱中有 10 个种群被 *Wolbachia* 感染。本项研究结合 Nirgianaki 等（2003）的研究结果可知，烟粉虱入侵种群（B 型和 Q 型）被 *Wolbachia* 感染的比例远远低于其它非 B/Q 型烟粉虱的感染率。因此，可以推测烟粉虱入侵种群（B 型和 Q 型）暴发成灾和 *Wolbachia* 密切相关，即可能逃离了 *Wolbachia* 对它们的负面效应，支持了外来生物入侵机制的“逃避天敌假说”（Mitchell and Power，2003；Torchin *et al*.，2003）。

Wolbachia 对 B 型和 Q 型烟粉虱的成功入侵的影响可能来自 2 个方面。一方面可能是 B 型和 Q 型烟粉虱逃避了 *Wolbachia* 感染所导致的生理代谢的负面影响；近年来的研究表明，*Wolbachia* 不同品系对不同的宿主产生的生物学影响具有一定的差异，如某些 *Wolbachia* 品系能够引起果蝇的组织退化甚至死亡（Hoffmann *et al*.，1990；Min and Benzer，1997），引起果蝇寄生蜂 *Leptopilina heterotoma* 工蜂生殖力、成虫存活率和运动能力的明显降低（Fleury *et al*.，2000），导致蚂蚁 *Formica truncorum* 群体的生殖力降低（Wenseleers *et al*.，2002）。另一方面，*Wolbachia* 感染烟粉虱所导致的生殖隔离可能促进了 B 型和 Q 型烟粉虱种群的入侵；已有研究表明 B 型烟粉虱和多数非 B 型烟粉虱产生生殖隔离（Bedford *et al*.，1994；Brown *et al*.，1995；Byrne *et al*.，1995），从而使得 B 型烟粉虱通过生殖干涉的方式成功入侵世界各地（褚栋等，2004）；De Barro 和 Hart（2000）认为 *Wolbachia* 可能是 B 型和许多非 B 型烟粉虱生殖隔离的重要因素之一。

致谢 美国 Arizona 大学 Judy Brown 博士、美国农业部 Matthew Ciomperlik 博士、以色列 Volcani Center 农业研究中心 Rami Horowitz 博士、中国农业科学院农业环境与持续发展研究所万方浩研究员、浙江大学应用昆虫学研究所刘树生教授、中国农业科学院植保所雷仲仁研究员、北京市农林科学院植物保护环境保护研究所罗晨、昆虫生理生态国际研究所夏云龙博士、南京农业大学植保学院韩兰芝博士为本项研究提供了国内外烟粉虱种群，河南省农业科学院植保所昆虫组刘爱芝、韩素娟等老师在烟粉虱采集中提供了帮助，在此表示感谢！

参考文献（References）

Bedford ID，Briddon RW，Brown JK，Rosell RC，Markham PG，1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci*（Gennadius）biotypes from different geographic regions. *Annals of Applied Biology*，125（2）：311－325.

Brown JK，Coats SA，Bedford ID，Markham PG，Bird J，Frohlich DR，1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly，*Bemisia tabaci*（Genn.）（Homoptera：Aleyrodidae）. *Biochemical Genetics*，33（7－8）：205－214.

Byrne FJ，Cahill M，Denholm I，Devonshire AL，1995. Biochemical identification of interbreeding between B-type and non B-type strains of tobacco whitefly *Bemisia tabaci*. *Biochemical Genetics*，33（1－2）：13－23.

Chu D，Zhang YJ，Cong B，Xu BY，Wu QJ，2004. The invasive mechanism of a world important pest，*Bemisia tabaci*（Gennadius）biotype B. *Acta Entomologica Sinica*，47（3）：400－406.［褚栋，张友军，丛斌，徐宝云，吴青君，2004. 世界性重要害虫 B 型烟粉虱的入侵机制. 昆虫学报，47（3）：400－406］

Chu D，Zhang YJ，Cong B，Xu BY，Wu QJ，2005a. Identification for Yunnan Q-biotype *Bemisia tabaci*（Gennadius）population. *Entomological Knowledge*，42（1）：59－62.［褚栋，张友军，丛斌，徐宝云，吴青君，2005a. 云南 Q 型烟粉虱种群的鉴定. 昆虫知识，42（1）：59－62］

Chu D，Zhang YJ，Cong B，Xu BY，Wu QJ，Zhu GR，2005b. Sequences analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different geographical populations of *Bemisia tabaci*（Gennadius）. *Agricultural Sciences in China*，38（1）：76－85.［褚栋，张友军，丛斌，徐宝云，吴青君，朱国仁，2005b. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学，38（1）：76－85］

De Barro PJ，Hart PJ，2000. Mating interactions between two biotypes of the whitefly，*Bemisia tabaci*（Hemiptera：Aleyrodidae）in Australia. *Bulletin of Entomological Research*，90(2)：103–112.

Fleury F，Vavre F，Ris N，Fouillet P，Bouletreau M，2000. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology*，121(5)：493–500.

Gong P，Shen ZR，Li ZH，2002. *Wolbachia* endosymbionts and their manipulation of reproduction of arthropod hosts. *Acta Entomologica Sinica*，45(2)：241–252.［龚鹏，沈佐锐，李志红，2002. *Wolbachia* 属共生细菌及其对节肢动物生殖活动的调控作用. 昆虫学报，45(2)：241–252］

Hoffmann AA，Turelli M，Harshman LG，1990. Factors affecting the distribution of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*，126(4)：933–948.

Jeyaprakash A，Hoy MA，2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification：*wsp* sequences found in 76% of sixty three arthropod species. *Insect Molecular Biology*，9(4)：393–405.

Kumar S，Tamura K，Jakobsen IB，Nei M，2001. MEGA2：Molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*，17(12)：1 244–1 245.

Mitchell CE，Power AG，2003. Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature*，421(6 923)：625–627.

Min KT，Benzer S，1997. Genetics *Wolbachia*，normally a symbiont of *Drosophila*，can be virulent，causing degeneration and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*，94 (20)：10 792–10 796.

Nirgianaki A，Banks GK，Rrohlich SR，Veneti Z，Braig HR，Miller TA，Bedford ID，Markham PG，Savakis C，Bourtzis K，2003. *Wolbachia* infections of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology*，47(2)：93–101.

Perring TM，2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Prot.*，20(9)：725–737.

Shoemaker DD，Ross KG，Keller L，Vargo EL，Werren JH，2000. *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). *Insect Molecular Biology*，9(6)：661–673.

Thompson JD，Gibson TJ，Plewniak F，Jeanmougin F，Higgins DG，1997. The ClUSTAL-X windows interface：flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*，25(24)：4 876–4 882.

Torchin ME，Lafferty KD，Dobson AP，McKenzie VJ，Kuris AM，2003. Introduced species and their missing parasites. *Nature*，421(6 923)：628–630.

Tsutsui ND，Kauppinen SN，Oyafuso AF，Grosberg RK，2003. The distribution and evolutionary history of *Wolbachia* infection in native and introduced populations of the invasive argentine ant (*Linepithema humile*). *Mol. Ecol.*，12(11)：3 057–3 068.

Werren JH，1997. Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*，42：587–609.

Wenseleers T，Sundstrom L，Billen J，2002. Deleterious *Wolbachia* in the ant *Formica truncorum*. *Proc. Biol. Sci.*，269(1 491)：623–629.

Zhou W，Rousset F，O'Neill S，1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. Biol. Sci.*，265(1 395)：509–515.

（责任编辑 袁德成）